

## Embryotransplantatie bij het paard: onmisbaar in de moderne fokkerij

### *Embryo transfer in horses: essential to modern breeding*

<sup>1</sup>L.T.M.Vandenberghe, <sup>1</sup>J. Govaere, <sup>1</sup>H.Nelis, <sup>1</sup>M. Hoogewijs, <sup>2</sup>P. Daels, <sup>1</sup>A.Van Soom

<sup>1</sup>Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

<sup>2</sup>Keros ET center, Hoenstraat 7, B-8980 Beselare, België

#### SAMENVATTING

Embryotransplantatie bij het paard is een voortplantingstechniek waarbij een embryo van een waardevolle donormerrie wordt uitgespoeld en overgeplant in een draagmerrie. Dit heeft tal van voordelen. Praktisch behelst deze techniek verschillende aspecten. Vooraf dient de cyclus van de draagmerrie gesynchroniseerd te worden met die van de donor. Daarna dient men op het juiste tijdstip het embryo uit de baarmoeder van de drachtige donormerrie te spoelen. Na het opzoeken en wassen van het embryo wordt het ingeplant bij de draagmerrie of receptor. Na de geboorte wordt het veulen nog geruime tijd door de receptor gezoogd.

Bij het spoelen van de donormerrie wordt in ongeveer 50% van de gevallen een embryo gecollecteerd en na het overplanten van een embryo wordt uiteindelijk gemiddeld 70% van de receptormerries drachtig. Uiteraard worden deze percentages in de praktijk door verschillende factoren beïnvloed. Deze factoren hebben zowel betrekking op de donor als op de receptor.

#### ABSTRACT

Nowadays, a valuable competition mare can produce offspring without interrupting its sport career which is made possible by a technique called embryo transfer. The valuable mare is inseminated and an embryo is flushed seven days later. The early embryo is then transferred to the uterus of a recipient mare that carries the pregnancy to term.

In 50% of the cases, flushing of the donor mare results in an embryo. After transfer, an average of 70% of the recipient mares become pregnant. These percentages are influenced by several factors related to both the donor and recipient mares.

#### INLEIDING

De paardenhouderij in België kent de laatste jaren een geweldige opmars. Niet alleen voor het fokken van paarden voor recreatief gebruik maar ook wat de productie van topsportpaarden betreft kent ons land internationaal aanzien. In 2008 werd in opdracht van Vlaams minister van landbouw en plattelandsbeleid, Kris Peeters, onderzocht wat het economisch belang is van de paardensector in Vlaanderen (Vlaamse Landmaatschappij, 2008). Naar schatting telt onze regio meer dan 150 000 paarden en zijn maar liefst 200 000 Vlamingen actief in de paardenwereld. De hippische sector was op dat ogenblik goed voor een toegevoegde waarde van ongeveer 215 miljoen euro. De jaarlijkse omzet van bedrijven, zoals spermawinstations, inseminatiecentra en embryotransplantatiecentra werd op circa 10,4 miljoen euro geschat. Een vierde van dit bedrag werd verwezenlijkt door de embryotransplantatiecentra resulterend in meer dan 800 drachtige receptormerries per jaar. Dit is ongeveer 10% van het totaal aantal veu-

lens waaraan in 2007 een EU-paspoort werd toegekend door Vlaamse stamboekverenigingen. Ook in de ons omringende landen is de paardenfokkerij een belangrijke en winstgevende sector. Een deel van de in België geïmporteerde embryo's is dan ook van buitenlandse afkomst.

Embryotransplantatie (ET) is een voortplantingstechniek waarbij een embryo van een waardevol donordier wordt uitgespoeld en vervolgens wordt overgeplant in een receptor. Nadat de techniek in de jaren vijftig van de vorige eeuw met succes werd toegepast bij het rund en het varken, werd in de jaren '70 gestart met embryotransplantatie bij het paard (Betteridge, 2003). De geboorte van het eerste veulen na embryotransplantatie vond plaats in 1974 (Oguri en Tsutsumi, 1974). Pas in de jaren '90 kende ET een echte commerciële doorbraak. De techniek werd vooral in Argentinië bij polo pony's toegepast (Pashen et al., 1993; Allen, 2005). Tegelijk nam ook in Noord-Amerika, Brazilië en Europa de interesse voor deze voortplantingsmethode in de paardenfokkerij toe. Dit heeft geleid tot het ontstaan

van gespecialiseerde embryotransplantatiecentra. In België telde men in 2010 twintig embryotransplantatiecentra voor het paard (elf nationale en negen erkend door de Europese Unie) (Vlaamse Overheid, 2010).

Het kernidee van embryotransplantatie is het feit dat het embryo van een donormerrie wordt overgeplant en zijn ontwikkeling doormaakt in de uterus van een draagmoeder, die verschillend is van de biologische moeder. Dit concept brengt tal van voordelen met zich mee. Om te beginnen voorkomt embryotransplantatie dat de sportcarrière van de donormerrie vanwege dracht onderbroken dient te worden en is men in staat om te fokken met donormerries die slechts twee jaar oud zijn (Vanderwall, 2000). Deze factoren zorgen voor het verkorten van het generatie-interval, wat bij het paard vrij lang is (acht tot twaalf jaar; Ström en Philipsson, 1978) en vaak kunstmatig verlengd wordt door een eventuele sportcarrière. Dit gegeven is vooral van belang bij warmbloeden, met name jumping- en dressuurpaarden, die vaak tot op hoge leeftijd blijven presteren en dus in die periode niet drachtig kunnen zijn. Een lang generatie-interval houdt in dat men minder snel genetische vooruitgang boekt, aangezien er pas op latere leeftijd veulens geboren worden uit topdieren. Terwijl bij de natuurlijke voortplanting slechts één veulen per jaar per merrie geboren wordt, zorgt ET ervoor dat jaarlijks meerdere veulens van eenzelfde merrie geregistreerd kunnen worden (Squires, 2009). Dit impliceert dat ET de moderne fokker in staat stelt om beter te selecteren aangezien men meer nakomelingen kan verkrijgen van genetisch interessante merries. Ook merries met bepaalde vormen van subfertiliteit kunnen op deze manier alsnog hun genetisch materiaal doorgeven (Wilsher en Allen, 2004). Dit vormt een derde toepassing van embryotransplantatie. Twintig jaar geleden was men in de veronderstelling dat ET dé manier was om 'laatstekansembryo's' te verkrijgen van oudere subfertiele merries. Helaas is gebleken dat oudere merries (> 20 jaar) geen ideale kandidaten zijn voor ET aangezien de dalende eicelkwaliteit een bijkomende limiterende factor vormt (Vanderwall, 2000). In de praktijk ziet men dat fokkers voornamelijk geïnteresseerd zijn in ET bij hun probleemdonoren en sportpaarden en dat het registreren van meerdere veulens per merrie per jaar vaak van ondergeschikt belang is.

Hoewel ET tegenwoordig niet meer weg te denken valt uit de wereld van de moderne paardenfokkerij waren de resultaten in het begin echter redelijk teleurstellend. Embryotransplantatie heeft dan ook een tragere ontwikkeling gekend bij het paard dan bij het rund. Dit was deels te wijten aan de beperkte ondersteuning vanuit verscheidene stamboeken. Tegenwoordig vormen deze restricties geen hinderpaal meer en is het registreren van veulens verkregen door embryotransplantatie toegestaan in de meeste stamboeken met uitzondering van de Jockey Club, de Thoroughbred Association (Long et al., 2003) en de Franse Draver (Stamboekreglement van de Franse Draver).

De belangrijkste redenen voor de minder efficiënte ET bij het paard zijn enerzijds de bijzondere voortplan-

tingsfysiologie van de merrie, waardoor slechts een beperkt aantal geovuleerde eicellen per cyclus (één à twee) vrijgezet kunnen worden en anderzijds de lage vitaliteit van paardenembryo's na het invriezen en ontdooien (Scherzer et al., 2008). Deze factoren vormen de voornaamste minpunten van ET vanuit commercieel oogpunt.

Ondanks deze "schoonheidsfoutjes" kent embryotransplantatie bij het paard een geweldige opmars in Europa. In dit artikel worden de procedure en de belangrijkste factoren die invloed hebben op het slaggingspercentage besproken.

## TECHNIEK

De procedure van embryotransplantatie bestaat uit drie verschillende onderdelen: (1) het spoelen van het embryo, (2) het transplanteren van het embryo en (3) het synchroniseren van de donor- en receptormerrie. Elke stap heeft specifieke risicofactoren die het succes van deze techniek in de praktijk bepalen.

## Synchronisatie van donor- en receptormerrie

De synchronisatie is een van de meest cruciale stappen in het embryotransplantatieproces. De uterus van de receptormerrie moet namelijk klaar zijn om het embryo onder ideale omstandigheden te ontvangen (Wilsher et al., 2010). Bij het paard beschikt men over een tijdsvenster van ongeveer vier dagen waarbinnen de transfer kan plaatsvinden. De receptormerrie kan één dag eerder tot drie dagen later geovuleerd hebben dan de donor zonder dat het drachtigheidspercentage hieronder lijdt (Squires en Seidel, 1995). Verscheidene synchronisatieprocedures kunnen worden toegepast afhankelijk van het aantal receptormerries dat men ter beschikking heeft (Stout, 2006). Idealiter streeft men naar de synchronisatie van minimaal twee à drie receptormerries per donormerrie (McKinnon en Squires, 2007).

Indien men een groot aantal receptormerries ter beschikking heeft, kan men de receptormerries op regelmatige basis echografisch onderzoeken (Stout, 2006). Op deze manier heeft men een overzicht en weet men exact op welk tijdstip in de cyclus elke merrie zich bevindt.

Beschikt men echter maar over een beperkt aantal merries dan dient de synchronisatie plaats te vinden met behulp van hormonale therapie (Allen, 2005). Dit kan door middel van prostaglandines ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) in aanwezigheid van een gevoelig corpus luteum. Ongeveer twee à vijftien dagen na de toediening van  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vindt dan een volgende ovulatie plaats (Bristol, 1981). Omdat dit een te grote variatie inhoudt, heeft men geprobeerd om dit tijdsvenster te vernauwen. Dat is mogelijk met behulp van een tweede injectie veertien dagen later. Hierbij vindt ovulatie plaats zeven tot tien dagen (met een variatie van nul tot zeventien dagen) na de tweede injectie (Holtan et al., 1977; Bradecamp, 2007). Dit impliceert opnieuw een vrij grote variatie met betrekking tot het ovulatietijdstip. Een andere mogelijk-

heid bestaat uit het echografisch opvolgen van het corpus luteum bij de merrie. Indien een receptief corpus luteum op het ovarium aanwezig is, kan het toedienen van prostaglandines gemiddeld acht dagen (met een variatie van twee dagen) later tot een ovulatie leiden (Palmer, 1978).

Een alternatief biedt zich aan onder de vorm van progestagenen. Progestagenen worden tien dagen toegediend (intramusculair of per oraal) met op de laatste dag van de toediening een bijkomende PGF<sub>2α</sub>-injectie (Allen, 2005). Recent kunnen progestagenen ook intravaginaal worden toegediend (Cue-Mare®), zoals bij het rund (Grimmett et al., 2002). De intravaginale progesterontherapie is niet geregistreerd voor het paard in België.

Een derde mogelijkheid is het gebruik van geovariëctomiseerde merries of merries in anoestrus. Deze merries moeten voorbereid worden met behulp van progestagenen (Hinrichs et al., 1986) en oestrogenen.

### Het spoelen van de donormerrie

De donormerrie wordt bevrucht via natuurlijke dekking of kunstmatige inseminatie met vers, gekoeld of diepvriessperma. Hiertoe is het noodzakelijk de donormerrie nauwgezet op te volgen door middel van echografische controle van de follikelgroei en het tijdstip van ovulatie. De kennis van het exacte tijdstip van ovulatie is van cruciaal belang aangezien op dag zeven of acht na de ovulatie de baarmoeder gespoeld moet worden om het eventuele embryo te recupereren (Iuliano et al., 1985). Indien men eerder spoelt dan op dag zeven, loopt men het risico dat het embryo de baarmoeder nog niet bereikt heeft (Boyle et al., 1989). Het embryo bereikt de uterus als late morula of vroege blastocyst, ongeveer 156 tot 168 uur na de ovulatie (Battut et al., 2001). Spoelt men later dan op dag acht, dan is het snelgroeiende embryo te groot om met het conventionele materiaal een vlotte manipulatie toe te laten, met eventueel schade tot gevolg (Wilsher et al., 2010). De diameter van het embryo verdubbelt namelijk dagelijks vanaf de eerste dag na aankomst in de uterus (Squires et al., 1985) (Tabel 1). Op dag acht na de ovulatie kan het embryo een grootte van 1132 µm bereiken terwijl de commerciële embryorietjes die gebruikt worden voor de transfer, gemaakt zijn voor embryo's kleiner dan 1000 µm (Squires et al., 1985; Vanderwall, 2000). Na afloop dient de donormerrie geïnjecteerd te worden met prostaglandines om het corpus luteum te vernietigen (McCue et al., 2010). Dit

voorkomt een eventuele dracht wanneer het embryo onverhoopt niet uit de uterus werd gespoeld en veroorzaakt een geïnduceerde oestrus, hetgeen een eventuele iatrogene infectie bekomen door het manipuleren van de uterus tijdens dioestrus, kan overwinnen.

Zoals reeds vermeld bereikt het paardenembryo ongeveer zes à zeven dagen na ovulatie de baarmoeder (Ginther, 1983; Battut et al., 2001) en kan het rond dag zeven dus vlot uit de baarmoeder gespoeld worden. Daartoe wordt, na het grondig reinigen en desinfecteren van het perineum van de merrie, een steriele Foleykatheter ingebracht in de uterus waarna de cuff opgeblazen en naar caudaal getrokken wordt teneinde het ostium internum cervicis af te sluiten (Wilsher en Allen, 2004). Het aantal liter vloeistof dat men aanwendt, is afhankelijk van de pariteit van de merrie en aldus ook van het volume van de baarmoeder (McCue et al., 2010). Tijdens het spoelen masseert men rectaal de baarmoeder zodat de vloeistof zich goed verdeelt en het embryo uit de endometriale plooien wordt losgemaakt (Vanderwall, 2000). De ingebrachte vloeistof wordt afgeheveld en de procedure wordt drie tot zes maal herhaald. Het herhaaldelijk spoelen verhoogt namelijk de kans op het verkrijgen van een embryo (Hinrichs, 1990). Ook het toedienen van oxytocine vlak vóór de laatste spoelbeurt zou door het stimuleren van de baarmoedercontracties een positieve invloed hebben op het verkrijgen van het embryo (Hudson en McCue, 2004).

Alhoewel verschillende spoelmedia gecommercialiseerd zijn voor het uitspoelen van het embryo bij het paard, kan een eenvoudige ringerlactaatoplossing, al dan niet gesupplementeerd met 0,5% foetaal kalfserum, met goed resultaat gebruikt worden (McCue et al., 2003).

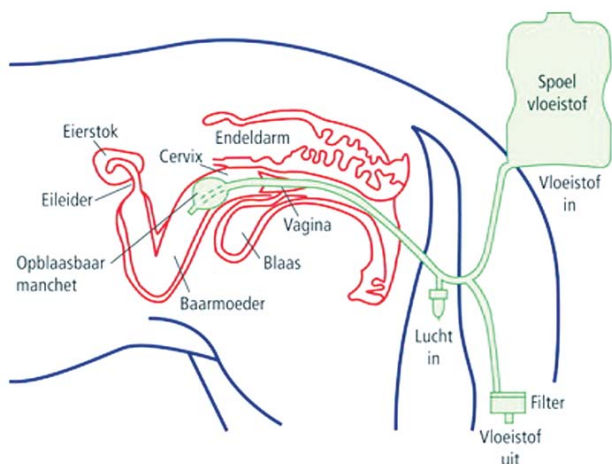
Men onderscheidt twee manieren van spoelen: de open en de gesloten methode. Bij de gesloten methode leidt men door middel van een Y-vormig spoelsysteem de verkregen spoelvloeistof rechtstreeks doorheen een 75µm-embryofilter (Vanderwall, 2000) (Figuur 1). Dit in tegenstelling tot de open methode waarbij men eerst de vloeistof opvangt en deze later in het labo handmatig filtert of decanteert (Figuur 2).

De inhoud van de filter wordt overgebracht in een petrischaaltje en onderzocht op de aanwezigheid van het embryo (lichtmicroscop: 10-15x vergroting). De meerderheid van de embryo's heeft op dag zeven of acht na ovulatie een gemiddelde diameter van 0,5 tot 1 mm en is in theorie met het blote oog zichtbaar (Squires et al., 1985; Stout, 2006). Toch is het noodzakelijk om het embryo op te zoeken met behulp van een lichtmicroscop (Figuur 3). Alleen zo kan men met zekerheid zeggen of er een embryo aanwezig is. Bovendien kan men de kwaliteit van het embryo beoordelen (vergroting 40 - 80x). Dit kan van belang zijn aangezien de kwaliteit in direct verband staat met het drachtigheidspercentage na transfer (McKinnon en Squires, 1988; Carnevale et al., 2000). Tijdens het opzoeken dient men te vermijden dat het embryo overmatig wordt blootgesteld aan plotse temperatuur-

**Tabel 1. Diameter van het paardenembryo in de uterus (naar Squires et al., 1985)**

Dagen na ovulatie	Gemiddelde grootte (µm)	Grenswaarden (µm)
6	208	132 – 756
7	406	136 – 1460
8	1132	120 – 3980
9	2220	730 – 4520





**Figuur 1.** Schematische voorstelling van de spoeling van de donormerrie via het gesloten systeem (naar Aquilar en Woods, 1997; <http://www.svp-wessel.nl/index.php?page=3&sub=11>; 28/11/2011).

schommelingen en niet-isotone oplossingen (Vanderwall, 2000).

Na het microscopisch onderzoek wordt het embryo overgebracht in een speciaal samengesteld medium en vervolgens herhaaldelijk gewassen. Voor het wassen kan men gebruik maken van een cultuurplaatje met welletjes die enkele milliliter wasmedium bevatten. Het spoelen van het embryo is noodzakelijk om celdebris en andere vormen van contaminatie te verwijderen (Daels, 2007).

Na het wassen kan men het embryo meteen overplanten, gekoeld transporteren of invriezen. Voor het transport (24 uur bij 5°C) beschikt men over een aantal gebufferde media, zoals Emcare® en Vigro Holding Plus® (Stout, 2006). Het transport kan gebeuren met behulp van een Equitainer®. Dit is een handige container ontwikkeld voor het vervoer van gekoeld sperma en embryo's waarbij een koeltemperatuur gegarandeerd wordt van 4 tot 6°C gedurende 36 uur (Douglas-Hamilton et al., 1984). Dit gekoeld transport wordt vaak in de praktijk gebruikt met goede resultaten (Carney et al., 1991). Het invriezen van paardembryo's is arbeidsintensief en de resultaten zijn nog niet optimaal. Een acceptabel drachtigheidspercentage (50 tot 60%) kan tot nu toe enkel bekomen worden wanneer het embryo zich in een vroegembryonaal stadium bevindt (dag 6 tot 6,5; diameter < 0,250 mm) (Tharanasit et al., 2005). Recent onderzoek naar het gebruik van cryopreservatie is echter veelbelovend en zou in de toekomst kunnen leiden tot betere resultaten in de praktijk (Choi et al., 2011).

Het transport van het embryo laat de dierenarts toe embryotransplantatie uit te voeren zonder zwaar te investeren in receptormerries. De dierenarts spoelt de merrie thuis en verzendt het embryo vervolgens naar een transplantatiecentrum. Bovendien hoeft de waardevolle donormerrie hiervoor haar vertrouwde omgeving niet te verlaten (Squires et al., 2003). De ontwikkeling van het gekoeld transport betekent dan ook een belangrijke evolutie en expansie van embryotransplantatie in de praktijk.

## Transplanteren van het embryo

Het embryo kan op verschillende manieren overgeplant worden bij de receptormerrie: chirurgisch en niet-chirurgisch. Op chirurgisch vlak heeft men de keuze tussen een aantal technieken: laparotomie ter hoogte van de linea alba onder algemene anesthesie (Allen, 1982) of via de flank, staand met sedatie (Squires et al., 1985). Recent heeft men twee nieuwe methoden uitgetest: transvaginale punctie van de baarmoeder en laparoscopische injectie via de flank (Muller en Cunaat, 2010). Aangezien de niet-chirurgische methode goedkoper, sneller en ethisch meer verantwoord is, wordt chirurgie niet meer toegepast en hier ook niet verder besproken (Squires et al., 2003; Stout, 2006).

Wanneer het embryo niet-chirurgisch wordt overgeplant, kan men gebruik maken van een cassoutransferringpipet of een inseminatiepipet die transcervicaal, onder vaginale begeleiding, in de uterus wordt gebracht. Het embryo zelf bevindt zich in een 0,25 - 0,5 ml-rietje. De cassoupipet wordt omgeven door een steriele, harde plastic beschermhuls met eromheen een flexibel plastic omhulsel ('chemise'). Wanneer de pipet zich in de cervix bevindt, wordt het omhulsel of de 'chemise'



**Figuur 2.** Het handmatig filteren van de spoelvloeistof.

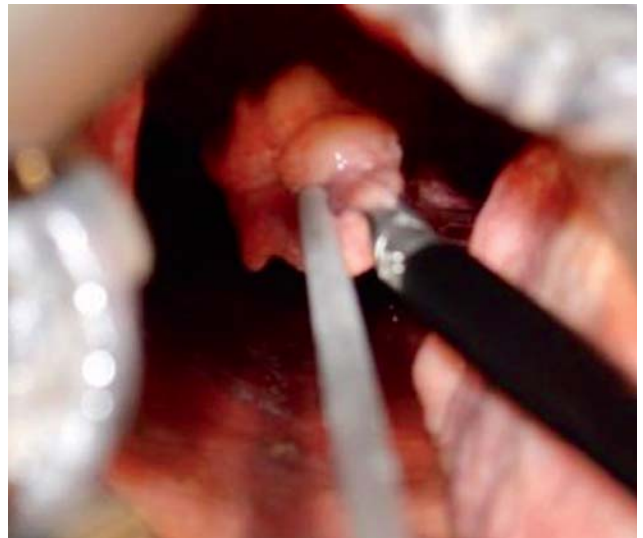


**Figuur 3.** Het microscopisch onderzoek van het embryo.

doorprikt en de pipet wordt verder opgeschoven tot in de baarmoeder (Daels, 2007). Men zorgt er steeds voor minimaal trauma toe te brengen aan de cervix waarbij men zo steriel mogelijk te werk gaat. Vroeger werd aangenomen dat oxytocinevrijstelling als gevolg van de manipulatie van de cervix aanleiding zou geven tot vroegembryonale sterfte (Handler et al., 2002). In meer recent onderzoek heeft men deze hypothese verworpen (Handler et al., 2006). Vooral inflammatie van het endometrium en endometritis als gevolg van de iatrogene inbreng van bacteriën in de baarmoeder onder progesteroninvloed, zouden de oorzaak zijn van een gedaald drachtigheidspercentage na embryo-transplantatie (Squires et al., 1999).

Omwillen van deze redenen werd een nieuwe transfertechniek ontwikkeld (Wilsher en Allen, 2004). Bij deze methode maakt men gebruik van een polansky-speculum, waarmee men de cervix visualiseert, en van een speciale weefselklem die de portio vaginalis cervicis naar caudaal trekt. De tractie op deze weefselklem, de “Wilsher equine embryo transfer forceps”, zorgt ervoor dat het cervicale kanaal wordt gladgestreken en in het verlengde van de baarmoeder komt te liggen, hetgeen het vlot inbrengen van de transferpipet mogelijk maakt (Wilsher en Allen, 2004) (Figuur 4). Het embryo brengt men rechtstreeks in de inseminatiepipet omgeven door 2,5 ml “holding medium”. Dit volume verkleint de kans dat het embryo aan de pipet blijft kleven en bijgevolg verloren gaat (Allen, 2005). Deze techniek zou niet alleen de schade aan het endometrium voorkomen en een goede steriliteit garanderen, maar is ook eenvoudig aan te leren en zeer efficiënt met een drachtigheidspercentage van 85% (Wilsher en Allen, 2004).

De maternale herkenning van de dracht is een fysiologisch proces dat cruciaal is voor het onderhouden van de dracht (Klein en Troedsson, 2011). Het is mogelijk dat het falen van dit proces de oorzaak is van een verminderd drachtigheidspercentage na de transfer van het embryo (Brinsko et al., 2011). Een medicamenteuze behandeling van de receptormerrie tijdens en na de transfer kan de maternale herkenning ondersteunen. De transfer van een embryo in de baarmoeder van de receptormerrie brengt namelijk een subklinische ontstekingsrespons teweeg die leidt tot het vrijstellen van prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) (Koblischke et al., 2010). Een massale vrijstelling van PGF2 $\alpha$  kan leiden tot het vernietigen van het corpus luteum (luteolyse). Het corpus luteum produceert progesteron, dat bij het paard noodzakelijk is om de dracht tot dag 100 in stand te houden (Allen, 2000). Nadien neemt de placenta de progesteronproductie over (Brinsko et al., 2011). Onder normale omstandigheden maakt het embryo zijn aanwezigheid in de uterus kenbaar door de productie van prostaglandine E2 en het verhinderen van de vrijstelling van cyclo-oxygenase 2 (Allen, 2001; Klein en Troedsson, 2011). Cyclo-oxygenase 2 speelt een belangrijke rol in de vrijstelling van PGF2 $\alpha$  door het endometrium (Zavy et al., 1978). De toediening van niet-steroïdale ontstekingsremmers (bijvoorbeeld flunixin meglumine) tijdens de transfer zou een positief



**Figuur 4.** De transfertechniek met behulp van de cervixklem en het polanskyspeculum.

effect hebben op het drachtigheidspercentage na ET door het inhiberen van cyclo-oxygenase (Koblischke et al., 2010). Bovendien kunnen de noodzakelijke progesteronspiegels gegarandeerd worden door het exogeen toedienen van progesteron gedurende de dracht of men kan de endogene progesteronproductie stimuleren met behulp van een hCG-injectie op het moment van de transfer (Arruda en Fleury, 2005). Indien men gebruik maakt van een geovariëctomiseerde merrie als receptor, dan is langdurige progesterontoediening sowieso noodzakelijk: vanaf ongeveer vijf dagen vóór de transfer tot dag 100-140 van de dracht (McKinnon en Squires, 2007). Bijkomend kan tijdens de transfer gebruik worden gemaakt van antibiotica (bijvoorbeeld sulfamethoxazole en trimetoprim), aangezien het manipuleren van de baarmoeder onder progesteroninvloed altijd risico's met zich meebrengt. De duur van de antibiotica- en progesteronbehandeling moet op individuele basis worden geëvalueerd (Brinsko et al., 2011). In de meeste gevallen worden evenwel geen antibiotica of hormonen toegediend en ook het gebruik van niet-steroïdale ontstekingsremmers kan achterwege worden gelaten zonder verminderde resultaten.

Een eerste drachtigheidscontrole bij de receptormerrie vindt vervolgens plaats op dag vijf of zeven na de transfer. Daarna kunnen controles volgen op dag 35, 45 en 60 van de dracht (McKinnon en Squires, 2007).

## BEÏNVLOEDENDE FACTOREN EN SUCCES

### Factoren met betrekking tot de donor en het spoelpercentage

Zowel de hengst als de donormerrie speelt een cruciale rol. De donormerrie dient namelijk bevrucht te worden alvorens een embryo kan worden gespoeld. Het percentage bekomen embryo's is aldus afhankelijk van de kwaliteit van het sperma en de bewaring (Squires et al., 1998), alsook van de vruchtbaarheid en de leeftijd van de donormerrie (Squires et al., 2003). Recent on-



derzoek heeft ook aangetoond dat merries in training, vooral onder warme en vochtige omstandigheden, veranderingen vertonen in hun follikelontwikkeling en ovulatie, hetgeen aanleiding kan geven tot een lager spoelpercentage (Mortensen et al., 2009). Het spoelpercentage bedraagt in theorie meer dan 70% indien de merrie jong is en geïnsemineerd wordt met vers sperma van een fertiele hengst (Stout, 2006). In de praktijk ligt dit percentage lager aangezien de donormerrie vaak ouder is (Carnevale en Ginther, 1995; Squires et al., 2003), een voorgeschiedenis heeft van infertiliteit of met diepvriessperma geïnsemineerd is (Squires et al., 2003).

Superovulatie kan het percentage bekomen embryo's drastisch verhogen, maar deze techniek werkt bij het paard niet optimaal (Losinno et al., 2001). Bij het rund heeft deze procedure gezorgd voor het commerciële succes van embryotransplantatie, aangezien hierdoor gemiddeld vijf tot zes embryo's per spoeling kunnen verkregen worden (Kafi en McGowan, 1997). Een beperkte superovulatie bij het paard kan bewerkstelligd worden met equine FSH (eFSH), waarbij een hoger aantal ovulaties (3,6 versus 1,0) en aldus een hoger aantal embryo's bekomen worden (1,9 versus 0,5 embryo's) (Niswender et al., 2003). Desalniettemin hebben enkele studies aangetoond dat deze embryo's een lagere kwaliteit hebben en resulteren in een lager drachtigheidspercentage bij de receptor (Raz et al., 2011). Er dient te worden opgemerkt dat eFSH in België niet geregistreerd is voor gebruik bij het paard.

Wanneer superovulatie niet wordt toegepast, is het herhaaldelijke spoelen tijdens opeenvolgende cycli van de donormerrie noodzakelijk om meerdere veulens te verkrijgen. Het inbrengen van vloeistof in de uterus kan een ontsteking veroorzaken van het endometrium (Palm et al., 2008). Onderzoek heeft echter niet kunnen aantonen dat het herhaaldelijke spoelen voor embryotransplantatie een negatieve invloed zou hebben op de vruchtbaarheid van de donormerrie (Aurich et al., 2011).

### **Factoren met betrekking tot de receptormerrie en het drachtigheidspercentage**

Het management van de receptormerries is een cruciaal onderdeel van embryotransplantatie. Zowel de synchronisatie als de selectie van de juiste receptor beïnvloedt in sterke mate het drachtigheidspercentage. Zoals eerder werd vermeld, is synchronisatie moeilijk maar essentieel. De receptor moet namelijk in staat zijn het embryo te onderhouden en te doen ontwikkelen tot een veulen, dat ze na de geboorte ook moet zogen.

Een goede receptormerrie moet over voldoende uierontwikkeling, een normale cyclus en goede moeder-eigenschappen beschikken (Crowell-Davis en Weeks, 2005). Zij dient in goede gezondheid te verkeren met een normaal voortplantingsstelsel. De receptormerrie mag geen endometritis, cysten of een pneumo/urovagina hebben. Het is belangrijk om vóór

de transfer de baarmoeder op inhoud/vocht te controleren en de tonus van de cervix na te gaan (Carnevale et al., 2000). Idealiter is de draagmoeder drie tot twaalf jaar oud (Squires et al., 1998). Onderzoek heeft aangetoond dat de grootte van de microcotyledonen optimaal is bij een multipare merrie tussen vijf en negen jaar oud (Wilsher en Allen, 2003). In de praktijk verkiest men nullipare merries of jonge merries die één à twee gezonde veulens ter wereld hebben gebracht (McKinnon en Squires, 2007). Ook de stokmaat speelt hierin een belangrijke rol. De stokmaat is gecorreleerd met de uterus capaciteit en de voorziening van voedingsstoffen door de placenta (Allen et al., 2002). De grootte van de uterus is namelijk bepalend vanwege de diffuse niet-invasieve epitheliochoriale placenta (Wilsher en Allen, 2003). Een eventuele achterstand of voorsprong die het veulen heeft opgelopen bij een te kleine respectievelijk te grote merrie kan later niet meer gecorrigeerd worden (Allen et al., 2002). De stokmaat van de receptormerrie moet dus vergelijkbaar zijn met de stokmaat van de donormerrie.

Onder ideale omstandigheden is er ongeveer 75 - 85% kans dat het embryo na transplantatie bij de receptor verder ontwikkelt (Iuliano et al., 1985; Allen, 2005).

### **DE TOEKOMST**

Het mag duidelijk zijn dat ET een uitermate belangrijke techniek is om de voortplantingscapaciteit van topmerries te verveelvoudigen, maar de donormerrie moet voldoende vruchtbaar zijn om het embryo te kunnen onderhouden voor zes à acht dagen. Bepaalde merries, met name deze met ovulatiestoornissen, uterus/oviductpathologie en hoge leeftijd, zijn niet aan te raden voor ET (Carnevale, 2008). Deze problemen kan men omzeilen met oöcytentransfer (OT)/ "gamete intrafallopian transfer" (GIFT) en in-vitrofertilisatie (IVF). Ondanks de vele pogingen van onderzoekers over de hele wereld slaagt men er niet in om IVF bij het paard efficiënt en herhaalbaar te maken. Het beperkte succes van deze techniek heeft geleid tot het introduceren van de meer succesvolle intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI), gebaseerd op de positieve resultaten bij de mens (Palermo et al., 1992). Niet enkel biedt ICSI een bruikbaar alternatief voor klassieke IVF maar het vormt ook een mogelijke behandeling voor de mannelijke subfertiliteit, wat niet mogelijk is met ET en OT (Hinrichs, 2005).

Hoewel bepaalde artificiële reproductietechnieken bij het paard nog maar in de kinderschoenen staan, zijn wetenschappers en fokkers steeds meer gaan geloven in het potentieel van deze technieken om vruchtbaarheidsproblemen op te lossen en genetische vooruitgang bij het paard te bewerkstellingen. Daar waar embryotransplantatie reeds frequent wordt toegepast, zijn in-vitrofertilisatie en in-vitro-embryocultuur momenteel van slechts weinig commercieel belang. De oorzaak ligt in het feit dat in-vitroreproductie bij het paard geen eenvoudige zaak is. In tegenstelling

tot het rund, waarbij men deze technieken reeds op grote schaal toepast, is het onderzoek bij het paard minder snel geëvolueerd. Zowel technische factoren, zoals de beperkte beschikbaarheid van slachthuis-ovaria als diersoortspecifieke eigenschappen, liggen aan de basis van de problematiek met betrekking tot in-vitroreproductie bij het paard. Desalniettemin zijn verscheidene onderzoeksteams erin geslaagd om de geboorte van een levend veulen te realiseren na in-vitromaturatie van een eicel (IVM), in-vitrofertilisatie/intracytoplasmatische sperma-injectie en in-vitro-embryocultuur (Li et al., 2001; Hinrichs, 2005; Galli et al., 2007). In België werd het eerste proefbuisveulen geboren in 2009 (Smits et al., 2010). Momenteel wordt verder gewerkt aan het in praktijk brengen van deze voortplantingstechniek.

## CONCLUSIE

Hoewel embryotransplantatie in het verleden bij het paard maar traag op gang kwam, biedt deze techniek tal van voordelen voor de moderne fokker. Embryotransplantatie valt dan ook niet meer weg te denken in landen als Argentinië, Brazilië en de Verenigde Staten (Squires et al., 2003). Ook België, Frankrijk, Nederland en Duitsland erkennen het potentieel van deze techniek (Allen, 2005). Daarnaast blijft ET van essentieel belang bij meer doorgedreven reproductieve technieken als IVM en ICSI. In België wordt ET in verscheidene KI-centra commercieel aangeboden. Embryotransplantatie is echter niet louter en alleen voorbehouden voor de grotere paardenkliniek of KI-centrum, ook de praktijkdierenarts kan zijn steentje bijdragen. Hij of zij kan het embryo spoelen en verzenden naar een embryotransplantatiecentrum. Ook grotere paardenklinieken kunnen deze rol vervullen of enkele receptormerries huisvesten, wat voldoende is bij een beperkte vraag van het cliënteel. Is de vraag naar ET groter, dan dient men zich te wenden tot een embryotransplantatiecentrum dat beschikt over voldoende receptormerries. Het management van een receptorkudde is echter geen eenvoudige opgave. Er dient aandacht te worden besteed aan huisvesting, dierenwelzijn en ziektepreventie. Bij het houden van een kudde receptormerries mag een correct vaccinatie- en ontwormingsschema niet ontbreken. Verder brengt het beheer van een receptorkudde heel wat administratie met zich mee onder de vorm van correcte identificatie (chip en paspoort) en verzekeringen. De voorwaarden met betrekking tot het ter beschikking stellen van de receptormerrie worden opgenomen in een overeenkomst tussen het embryotransplantatiecentrum en de klant. Ook in het kader van fertiliteitsbegeleiding dient men het overzicht te kunnen bewaren waarbij het gynaecologisch opvolgen van deze merries zeer arbeidsintensief is. Bovendien is een correcte synchronisatie van de donor- en receptormerrie niet eenvoudig maar ze oefent wel een belangrijke invloed uit op het slagingspercentage (Jacob et al., 2002; Scherzer et al., 2008).

## REFERENTIES

- Aguilar J., Woods G.L. (1997). Embryo transfer in horses: indications, technique, and expected outcomes. In: Youngquist R.S. (ed.). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Co., 208-213.
- Allen W.R. (1982). Embryo transfer in the horse. In: Adams C.E. (ed.). *Mammalian Egg Transfer*. CRC Press, Florida, 135-154.
- Allen W.R. (2000). The physiology of early pregnancy in the mare. In: *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP* 46, 338-354.
- Allen W.R. (2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 121, 513-527.
- Allen W.R. (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 310-329.
- Allen W.R., Wilsher S., Turnbull C., Stewart F., Ousey J., Rossdale P.D., Fowden A.L. (2002). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I: Development in utero. *Reproduction* 123, 445-453.
- Arruda R.P., Fleury D.C. (2005). Pregnancy rates and plasma progesterone concentrations in embryo recipient mares receiving hormone treatment. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 14, 95-96.
- Aurich C., König N., Budik S. (2011). Effect of repeated embryo collection on embryo recovery rate in fertile mares. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 419-422.
- Battut I., Granchamp des Raux A., Nicaise J.L., Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.F. (2001). When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. In: Katila T., Wade J.F. (eds). *Havemeyer Foundation Monograph Series No.3*. R & W Publications Ltd, Newmarket, 66-68.
- Betteridge K.J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science* 79, 203-244.
- Boyle M.S., Sanderson M.W., Skidmore J., Allen W.R. (1989). Use of serial progesterone measurements to assess cycle length, time of ovulation and timing of uterine flushes in order to recover equine morulae. *Equine Veterinary Journal* 21, 10-13.
- Bradecamp E.A. (2007). Estrous synchronization. In: Samper J.C., Pycock J.F., McKinnon A.O. (Ed.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier, Missouri, United States of America, 22-25.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D. (2011). Embryo transfer. In: Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D. (Eds). *Manual of Equine Reproduction*. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 276-288.
- Bristol F. (1981). Studies on estrous synchronization in mares. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenology*, 258.
- Carnevale E.M. (2008). Clinical considerations regarding assisted reproductive procedures in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 28, 686-690.
- Carnevale E.M., Ginther O.J. (1995). Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction Monograph* 1, 209-214.
- Carnevale E.M., Ramirez R.J., Squires E.L., Alvarenga M.A., Vanderwall D.K., McCue P.M. (2000). Factors af-

- fecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 54, 965-979.
- Carney N.J., Squires E.L., Cook V.M., Seidel G.E. Jr., Jasko D.J. (1991). Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology* 36, 23-32.
- Choi Y.H., Velez I.C., Riera F.L., Roldan J.E., Hartman D.L., Bliss S.B., Blanchard T.L., Hayden S.S., Hinrichs K. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 76, 143-152.
- Crowell-Davis S. L., Weeks J. W. (2005). Maternal behaviour and mare-foal interaction. In: Mills D., McDonnell S. (eds.). *The Domestic Horse, the Evolution, Development and Management of its Behaviour*. Cambridge, Cambridge University Press, 126-138.
- Daels P. (2007). Embryo transfer tips and tricks. In: *Proceedings 5th European Veterinary Conference*, Voorjaarsdagen, Amsterdam, 213-215.
- Douglas-Hamilton D.H., Osol R., Osol G., Driscoll D., Noble H. (1984). A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22, 291-304.
- Galli C., Colleoni S., Duchi R., Lagutina I., Lazzari G. (2007). Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 98, 39-55.
- Ginther O.J. (1984). Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. *Theriogenology* 21, 633-643.
- Grimmett J.B., Hanlon D.W., Duirs G.F., Jochle W. (2002). A new intra-vaginal progesterone releasing device (Cue-Mare) for controlling the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 58, 585-587.
- Handler J., Gomes, T., Waelchi, R.O., Betteridge, K.J., Raeside, J.I. (2002). Influence of cervical dilatation on pregnancy rates and embryonic development in inseminated mares. *Theriogenology* 58, 671-674.
- Handler J., Hoffmann D., Weber F., Schams D., Aurich C. (2006). Oxytocine does not contribute to the effects of cervical dilation on progesterone secretion and embryonic development in mares. *Theriogenology* 66, 1397-1404.
- Hinrichs K. (1990). Work in progress: A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology* 33, 937-942.
- Hinrichs K. (2005). Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology* 64, 535-541.
- Hinrichs K., Sertich P.L., Kenney R.M. (1986). Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology* 26, 455-460.
- Holtan D.W., Douglas R.H., Ginther O.J. (1977). Estrus, ovulation and conception following synchronization with progesterone, prostaglandin F<sub>2a</sub> and human chorionic gonadotropin in pony mares. *Journal of Animal Science* 44, 431.
- Iuliano M.F., Squires, E.L., Cook V.M. (1985). Effect of the age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *Journal of Animal Science* 60, 258-263.
- Jacob J.C.F., Domingues I.B., Gastal E.L., Gastal M.O., Silva A.G., Mello C.M., Gasparetto F. (2002). The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 57, 545.
- Kafi M., McGowan M.R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48, 137-157.
- Koblischke P., Budik S., Müller J., Aurich C. (2010). Practical experience with the treatment of recipient mares with a non-steroidal anti-inflammatory drug in an equine embryo transfer programme. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 1039-1041.
- Li X., Morris L.H., Allen W.R. (2001). Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 121, 925.
- Lopes E.P., Siqueira J.B., Pinho R.O., Guimarães J.D., Rocha N.A., Carvalho G.R., Torres C.A.A. (2011). Reproductive parameters of Mangalarga Marchador mares in a commercial embryo transfer program. *Reproduction of Domestic Animals* 46, 261-267.
- Losinno L., Aguilar J.J., Lisa H. (2001). Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: Katila T., Wade J.F. (eds.). In: *Proceedings of the 5th Internatinal Symposium on Equine Embryo Transfer*, Havemeyer Foundation Monograph Series 3, R&W Publications, Newmarket, 81-83.
- McCue P.M., Ferris R.A., Lindholm A.R., DeLuca C.A. (2010). Embryo recovery procedures and collection succes: results of 492 embryo-flush attempts. In: *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP* 56, Baltimore, MD, USA, 318-321.
- McCue P.M., Niswender K.D., Macon K.A. (2003). Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. *Journal of Equine Veterinary Science* 23, 1-2.
- McKinnon A.O., Squires E.L. (1988). Morphologic assessment of the equine embryo. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192, 401-406.
- McKinnon A.O., Squires E.L. (2007). Embryo transfer and related technologies. Samper, J.C., Pycock, J.F., McKinnon, A.O. (ed.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier, Missouri, United States of America, 319-334.
- Moussa M., Duchamp G., Mahla R., Bruyas J.-F., Daels P.F. (2002). Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24h in Ham's F-10 and emcare holding solutions. *Theriogenology* 58, 755-757.
- Mortensen C.J., Choi Y.H., Hinrichs K., Ing N.H., Kraemer D.C., Vogelsang S.G., Vogelsang M.M. (2009). Embryo recovery from exercised mares. *Animal Reproduction Science* 110, 237-244.
- Muller Z., Cuna L. (2010). Special surgical transfers of equine embryos. *Equine Veterinary Journal* 25, 113-115.
- Niswender K.D., Alvarenga M.A., McCue P.M., Hardy Q.P., Squires E.L. (2003). Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *Journal of Equine Veterinary Science* 23, 497-500.
- Oguri N., Tsutsumi Y. (1974). Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 41, 313-320.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17-18.
- Palm F.M., Walter I., Budik S., Kolodziejek J., Nowotny N., Aurich C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology* 70, 843-851.
- Palmer E. (1978). Control of the oestrous cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 495-505.
- Palmer E., Bézard J., Magistrini M., Duchamp G. (1991). In vitro fertilisation in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility* 44, 375-385.



- Pashen R.L., Lascombes F.A., Darrow M.D. (1993). The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal* 24, 119-121.
- Raz T., Green G.M., Carley S.D., Card C.E. (2011). Folliculogenesis, embryo parameters and post-transfer recipient pregnancy rate following equine follicle-stimulating hormone (eFSH) treatment in cycling donor mares. *Australian Veterinary Journal* 89, 138-142.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken R.A., Ray L., Hurley D.J., Heusner G.L. (2008). Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 371-376.
- Smits K., Govaere J., Hoogewijs M., De schauwer C., Van Haesebrouck F., Van Poucke M., Peelman L.J., Van Den Berg M., Vullers T., Van Soom A. (2010). Birth of the first ICSI foal in the Benelux. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79, 134.
- Squires E.L. (2009). Changes in equine reproduction: Have they been good or bad for the horse industry? *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 268-273.
- Squires E.L., Brubaker J.K., McCue P.M., Pickett B.W. (1998). Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology* 49, 743.
- Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M., Bruemmer J.E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59, 151-170.
- Squires E.L., Cook V.M., Voss J.L. (1985). Collection and transfer of equine embryos. In: *Bulletin No. 1. Ft. Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory*.
- Squires E.L., Garcia R.H., Ginther O.J. (1985). Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal* 17, 92-95.
- Squires E.L., McCue P.M. (2007). Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science* 99, 1-8.
- Squires E.L., McCue P.M., Vanderwall D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 51, 91-104.
- Squires E.L., Seidel G.E. Jr. (1995). Collection and transfer of equine Embryos. *Bulletin No. 08. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*, 32-62.
- Stout T.A.E. (2006). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal* 38, 467-478.
- Ström H., Phillipsson J. (1978). Relative importance of performance tests and progeny tests in horse breeding. *Livestock Production Science* 5, 303-312.
- Tharanasit T., Colenbrander B., Stout T.A.E. (2005). Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction* 129, 789.
- Vanderwall D.K., 2000: Current equine embryo transfer techniques. In: Ball B.A. (ed.). *Recent Advances in Equine Theriogenology*. International Veterinary Information Service (<http://www.ivis.org>), New Orleans, LA. Document no: A0204.0400.
- Wilsher S., Allen W. R. (2003). The effect of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal* 35, 476-483.
- Wilsher S., Allen W.R. (2004). An improved method for non-surgical embryo transfer in the mare. *Equine Veterinary Education* 16, 39-44.
- Wilsher S., Clutton-Brock A., Allen W.R. (2010). Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction* 139, 575-585.
- Zavy M. T., Bazer F. W., Sharp D. C., Frank M., Thatcher W. W. (1978). Uterine luminal prostaglandin F in cycling mares. *Prostaglandins* 16, 643-650.
- De paardensector als economische en maatschappelijke actor in Vlaanderen. Een analyse van het economisch en sociaal-maatschappelijk profiel en belang van de Vlaamse paardenhouderij (2008). *Studie uitgevoerd door de Policy Research Corporation in opdracht van de Vlaamse Landmaatschappij*.
- Stamboekreglement van de Franse Draver (Règlementation du stud book du Trotteur Français) (2010). *Inschrijving in het Stamboek*, artikel 7.
- Vlaamse Overheid (Departement Landbouw en Visserij: afdeling Duurzame Landbouwwontwikkeling). Centra Voortplantingstechnieken paard. *Jaarrapport 2010*, 7. <http://www.svp-wessel.nl/index.php?page=3&sub=11>; geraadpleegd op 28/11/2011.